



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Haptoglobinkoncentrationer hos kor efter kalvning

Victoria Andersson

Uppsala

2009

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:17*

Haptoglobinkoncentrationer hos kor efter kalvning

Victoria Andersson

Handledare: Madeleine Tråvén, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: Haptoglobin, kalvning, postpartum, nötkreatur, kor, kvigor

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:17*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
SYFTE	3
LITTERATURÖVERSIKT	4
Akutfasprotein	4
Haptoglobin hos nötkreatur	5
Allmänt	5
Analysmetoder	5
Sjuka och friska djur: värden på haptoglobin i andra studier	6
Haptoglobin runt kalvning - kor och kvigor	8
Användningsområden	13
MATERIAL OCH METODER	13
Djururval	13
Provtagning	14
Analys av blodprov	14
Statistisk metod	14
RESULTAT	15
Friska kor runt kalvning	15
Sjuka kor runt kalvning	17
Förstakalvare runt kalvning	18
DISKUSSION	19
SLUTSATS	22
LITTERATURFÖRTECKNING	23

SAMMANFATTNING

Haptoglobin är ett viktigt akutfasprotein hos nötkreatur och anses fungera som en bra inflammationsmarkör. Runt kalvning avviker haptoglobinvärdena korna uppvisar men studier som gjorts visar inga entydiga resultat. En del menar att de ej sett någon förändring efter kalvning medan andra studier visar en kraftig ökning i koncentration, vissa har till exempel sett värden över 0,5 g/l hos friska kor efter normal kalvning. Syftet med studien var därför att undersöka haptoglobinkoncentrationerna hos kor efter kalvning. Detta för att se om det finns några skillnader mellan friska kor före och efter kalvning, mellan friska och sjuka kor och mellan äldre kor och förstakalvare efter kalvning. Detta för att få en uppfattning om normalvärden och gränsvärden för kor efter kalvning. I den här studien var 29 2:a-kalvare och äldre kor med och av dessa karakteriserades 23 som friska och 6 som sjuka. De sjuka diagnosticerades inom en vecka efter kalvning med inflammationssjukdomar, kvarbliven efterbörd och/eller förlossningsproblem. De äldre korna provtogs en gång innan kalvning och 1, 2, 4 och 7 dagar efter kalvning och detta gjordes i samband med en annan studie. 12 förstakalvare var även med och alla dessa var friska. Dessa provtogs också i samband med en annan studie men dessa provtogs endast 2 gånger efter kalvning och på varierande dagar. Vid jämförelse mellan friska kor före och efter kalvning sågs en signifikant skillnad redan dag 1 och 2 efter kalvning ($P < 0,001$). Toppkoncentrationen sågs för de flesta djuren dag 2 efter kalvning och medelvärdet den dagen var 0,54 g/l. Endast 13 % av de friska korna låg över 0,8 g/l. 5 kor avvek från de övriga genom att endast visa en obetydlig ökning i haptoglobinkoncentration efter kalvning. Sjuka och friska kor jämfördes också och här sågs signifikanta skillnader tidigast dag 2 efter kalvning ($P < 0,05$). 67 % av de sjuka låg dessutom över 1,0 g/l dag 2 efter kalvning. Ingen signifikant skillnad kunde ses vid jämförelse mellan förstakalvare och friska kor. Förstakalvarna hade dock ett numeriskt högre värde men för få djur var med i studien för att få signifikanta skillnader. De slutsatser som drogs av studien var att haptoglobin ökar efter kalvning, hur kraftig ökningen blir varierar dock. Dag 2 synes vara en bra dag att övervaka haptoglobinkoncentrationerna på, då det var första dagen med signifikanta skillnader mellan sjuka och friska kor. 1,0 g/l verkar också vara ett bra gränsvärde för att förutse sjukdom. De flesta av de friska korna i den här studien låg under 0,8 g/l.

SUMMARY

Haptoglobin is an important acute phase protein in cattle and is believed to serve as a useful inflammatory marker. Around calving cows exhibit different haptoglobin concentrations, however studies performed do not show consistent results. Some researchers did not detect any change after calving, while other studies show a sharp increase in concentration, for example, values above 0.5 g/l in healthy cows after normal calving. The purpose of the study was to investigate haptoglobin concentrations in cows after calving to obtain normal values and threshold values for this period. In this study 29 multiparous cows were used. Of these 23 were characterized as healthy and 6 were characterized as diseased. The diseased were diagnosed within a week after calving with inflammatory diseases, retained placenta and/or obstetric problems. The multiparous cows were sampled once before calving and 1, 2, 4 and 7 days after calving within another study. 12 primiparous cows were also included in the study and all were healthy. These cows were also sampled within another study, but only twice after calving and on varying days. When comparing the healthy cows before and after calving, significant differences were seen from day 1 after calving ($P < 0.001$). Peak concentration was observed for most animals on day 2 after calving and the average concentration that day was 0.54 g/l. Only 13 % of the healthy cows had values above 0.8 g/l. 5 cows differed from the others by only showing a small increase in haptoglobin concentration after calving. Sick and healthy cows were also compared and significant differences were first seen on day 2 after calving ($P < 0.05$). 67 % of the patients also had higher concentrations than 1.0 g / l on day 2 after calving. No significant differences were seen when comparing primiparous cows and healthy multiparous cows. However primiparous cows had a numerically higher value, but too few animals were included in the study in order to obtain significant differences. The conclusions of this study were that haptoglobin increased after calving and the level of the increase varied. Day 2 seems to be suitable for monitoring haptoglobin concentrations, since this was the first day with significant differences between diseased and healthy cows. 1.0 g/l seems to be a good threshold value for the prediction of disease. Most of the healthy cows in this study had peak values below 0.8 g/l.

INLEDNING

I den tuffa ekonomiska verkligheten som råder för dagens lantbrukare ger sjukdomar och följande produktionsbortfall en kännbar förlust i plånboken. Detta gör att djurens hälsa är viktig för lantbrukare även ur en ekonomisk synvinkel, och inte bara som tecken på ett bra djurskydd. Både en tidig diagnostik för akuta och subkliniska sjukdomar hos enskilda djur samt en mer sammanfattande diagnostik för hälsoläget hos besättningen är av stort värde.

Mjölkkor går i samband med förlossningen in i en krävande och känslig period i sina liv. I samband med kalvning uppkommer många produktionsrelaterade sjukdomar varav en stor del är av infektiös/inflammatorisk karaktär. Då djuren befinner sig i början av sin produktiva tid är det viktigt att snabbt kunna diagnosticera eventuella problem för att minska produktionsbortfall. I dagens intensiva arbetsförhållande börjar det även bli viktigt att kunna förutse eventuella problem samt bedöma prognos för djuret. Detta för en tidig och korrekt utvärdering och eventuell behandling av djuret.

För att ställa diagnos på inflammation används i dagsläget vanligtvis hematologi. Detta är dock ej anpassat för att kunna användas för att utvärdera besättningar. Dessutom är det dyrt och relativt arbetskrävande, då bland annat blodutstryk krävs för korrekt avläsning. Hos nötkreatur är förändringar i den vita blodbilden vid inflammation mindre uttalade än hos hund och katt, vilket gör att hematologi ej heller är optimalt som hjälpmedel. Det är inte ovanligt att leukocyt- och neutrofilantalet ligger inom det normala trots att djuret har en inflammation i kroppen. Akutfasproteiner betraktas som en bättre diagnostisk metod och hanteringen av provmaterialet är dessutom enklare. Haptoglobin, ett viktigt akutfasprotein hos nötkreatur, har länge studerats för dess användbarhet som eventuell inflammationsmarkör. Runt kalvning avviker dock värdena för bland annat haptoglobin och de värden som setts i studier varierar. Detta har gjort att inga riktiga normalvärden och gränsvärden finns för nötkreatur runt kalvning.

SYFTE

Syftet med studien var att undersöka haptoglobinkoncentrationer hos förstakalvare och äldre kor efter kalvning. Detta för att se om nivåerna skiljer sig åt före och efter kalvning, samt eventuella skillnader mellan förstakalvare och äldre kor, och mellan sjuka och friska kor. Då de studier som publicerats skiljer sig kraftigt åt ifråga om haptoglobinnivåer efter kalvning var ett syfte att få fram normalvärden samt eventuellt gränsvärden för kor runt kalvning för den analysmetod som användes i studien. Sådana gränsvärden kan sedan tillämpas i framtida studier och klinisk verksamhet som diagnostiska och prognostiska verktyg.

LITTERATURÖVERSIKT

Akutfasprotein

Akutfasproteiner är en grupp av proteiner vilka aktiveras vid en akutfasreaktion. Detta är en del av det medfödda immunförsvaret, ett skydd kroppen snabbt kan sätta igång men som inte har något minne, till skillnad från till exempel antikroppar. Akutfasreaktionen aktiveras av kroppen vid till exempel inflammation, infektion eller trauma. Ett helt nätverk av effekter sätts igång, där makrofager och blodplättar aktiveras, olika cytokiner och andra chemotaktiska substanser utsöndras och leukocyter ansamlas i den påverkade vävnaden (Baumann och Gauldie, 1994). Som en del i detta försvar utsöndras akut fas proteiner från levern. Dessa medverkar till att försöka behålla homeostasen i kroppen och samtidigt begränsa mikrobiell tillväxt (innan kroppen hunnit utveckla ett förvärvat försvar) (Murata et al, 2004).

Stress har också visats stimulera produktion av akutfasproteiner (Lomborg et al 2008). Hur detta sedan är relaterat till substanser vilka produceras vid stress (till exempel glukokortikoider) är dock mer osäkert då inga tydliga resultat uppnåtts ännu. En trolig orsak kan dock vara ökningen av glukokortikoider (Lomborg et al 2008). I studier har stimulering av glukokortikoider visats ge en verkan på hepatocyter och en ökning i akutfasproteiner (Baumann et al 1989). Akutfasproteiner har även setts öka runt tiden för kalvning (Uchida et al 1993).

Akutfasreaktionen inleds med att makrofager eller monocyter i blodet stimuleras till utsläpp av cytokiner (Baumann och Gauldie 1994, Murata H. et al 2004, Eicher, S.D. et al, 2007). Dessa cytokiner är proteiner vilka fungerar som budbärare mellan olika celler. Cytokinerna stimulerar sedan hepatocyterna till produktion och utsöndring av akutfasproteiner (Baumann och Gauldie 1994, Petersen et al 2004). De huvudsakliga cytokiner som medverkar till detta är interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) och tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) (Baumann och Gauldie 1994, Petersen et al 2004). Dessa stimulerar levern till produktion av till exempel α_1 acid glycoprotein, serum amyloid A, C-reactive protein, haptoglobin och fibrinogen (Baumann och Gauldie 1994, Petersen et al 2004).

Det finns positiva och negativa akutfasproteiner. De positiva akutfasproteinerna ökar i koncentration i blodet efter stimulering och dessa är olika glykoprotein (Murata et al 2004). Vid ökad produktion av de positiva akutfasproteinerna, sjunker produktionen av de negativa akutfasproteinerna (albumin och transferrin) och följaktligen sjunker koncentrationerna i blodet (Murata et al 2004). Detta ses som hypoalbuminemi vid inflammation och infektion. Enligt Eckersall (2007) har dock de negativa akutfasproteinerna ännu ej kommit fullt till sin rätta inom veterinärmedicinen.

Det finns en mängd olika positiva akutfasproteiner och dessa har olika stor betydelse hos olika djurslag (Alsemgeest et al 1993). Enligt Eckersall (2007) ska koncentrationen för ett betydande akutfasprotein vara låg hos friska djur men sedan stiga upp till 1000 gånger basnivån. Toppkoncentrationen ska även vara nådd 24-48 timmar efter stimulering för att sedan sjunka relativt snabbt (Petersen

et al 2004, Eckersall 2007). Hos nötkreatur är det framför allt haptoglobin och serum amyloid A som är de huvudsakliga akutfasproteinerna (Alsemgeest et al 1994, Horadagoda et al 1999, Petersen et al 2004, Murata et al 2004, Eckersall et al 2001, Eckersall 2007). Andra akutfasproteiner hos nötkreatur är α_1 acid glycoprotein, ceruloplasmin och fibrinogen, men dessa är av mindre betydelse (Petersen et al 2004, Eckersall 2007).

Haptoglobin hos nötkreatur

Allmänt

Haptoglobin är ett α -globulin (Eckersall och Conner 1988) och har visats väga mer än 1000 kDa (Eckersall och Conner 1990). Som de flesta akutfasproteiner har haptoglobin flera olika verkningsmekanismer. Den mekanism som anses viktigast är förmågan att bilda stabila föreningar med hemoglobin (Petersen et al 2004). Genom detta förhindrar kroppen förlust av järn, samt begränsar bakteriernas åtkomst till järnet. Haptoglobin har på så sätt en bakteriostatisk effekt (Petersen et al 2004, Huzzey et al 2009). Förmågan att binda till hemoglobin kan dock störa analyser av haptoglobin i blodprov. Om det uppstår hemolys i blodet eller i blodprovet binder haptoglobinet genast upp det fria hemoglobinet och haptoglobin kan ej analyseras på korrekt sätt (Makimura och Suzuki, 1982).

Hos nötkreatur är haptoglobin ett viktigt akutfasprotein. Conner et al (1988) visade att haptoglobin ej fanns i någon noterbar koncentration i blodet hos friska nötkreatur men steg över 100 gånger ursprungsvärdet vid inflammation. Liknande resultat har även Alsemgeest et al (1994) fått vid en studie av eventuell koncentrationsförändring hos nötkreatur som insjuknat i inflammatoriska sjukdomar. Haptoglobin finns alltså i låg koncentration hos friska djur men stiger sedan kraftigt vid ett inflammatoriskt tillstånd (Makimura och Suzuki 1982, Conner et al 1986). Detta skiljer det bovina haptoglobinet från till exempel det humana som är ett normalt förekommande serum protein (Eckersall och Conner 1988). Haptoglobinkoncentrationen stiger i blodet 24-48 timmar efter inflammationen har tagit sin början och går tillbaka till normala nivåer efter cirka 7-10 dagar (Conner et al 1988, Eicher et al 2007). Andra tillstånd i kroppen hos nötkreatur har också visat ge en ökning av haptoglobinkoncentrationen i blodet. Exempel på detta är fettleversyndromet, svält, dexametasongiva, stress och kalvning (Murata et al 2004).

Analysmetoder

Eckersall et al (1999) tar i sin diskussion angående standardisering av akutfasproteiner upp olika analysmetoder för bland annat haptoglobin. Haptoglobin har en stark förmåga att binda till hemoglobin och detta har utnyttjats som grund för rutin biokemiska analyser. Dessa metoder kommer hädanefter i texten refereras till som hemoglobin-binding assay. Exakt hur förmågan att binda hemoglobin sedan kvantifieras varierar. Det enklaste sättet är att mäta absorbansen av hemoglobin med hjälp en spectrophotometer. När haptoglobinet binder till hemoglobinet sker en förändring i absorbansen vilket kan relateras till haptoglobinkoncentrationen. En annan variant vid användandet av haptoglobins hemoglobinbindande förmåga är att mäta peroxidasaktivitet. Hemoglobin har peroxidas-förmåga som försvinner vid lågt pH. Om hemoglobinet istället binds till

haptoglobin bibehålls peroxidasaktiviteten, som kan mätas för att få fram haptoglobinkoncentrationen.

Eckersall et al (1999) anger också i sin diskussion att hur resultaten från liknande studier redovisas ska skilja sig åt. Detta beroende på om analysen är kalibrerad eller ej. Vissa använder den mängd hemoglobin som binds upp av haptoglobin som en direkt indikation på mängden haptoglobin i provet och resultaten ska då anges i hemoglobinbindande kapacitet (HbBC). Om istället analysen är kalibrerad med antingen rent haptoglobin eller ett standardprov kan resultaten anges i haptoglobin g/l.

Vanligast för akutfasproteiner generellt är dock immunoassays och en mängd olika av dessa har beskrivits i litteraturen för olika proteiner, ett flertal finns även för haptoglobin. Exempel på dessa är immunodiffusion och enzymimmunoassay.

Sjuka och friska djur: värden på haptoglobin i andra studier

Då haptoglobin stiger kraftigt vid, bland annat, inflammatoriska tillstånd har många studier gjorts för att undersöka dess diagnostiska värde. Makimura och Suzuki (1982) såg att nivåerna hos friska och sjuka kor skiljde sig åt och att haptoglobin skulle fungera som en hjälp för att ställa diagnos på inflammatoriska tillstånd. De nivåer som uppmättes vid studien låg hos friska, normala kor mellan att ej vara mätbara och 0,051 g/l. Hos de sjuka korna låg nivåerna mellan 0,13 g/l och 1,27 g/l. (HbBC).

Conner et al (1988) ansåg även de att haptoglobin skulle kunna bli ett diagnostiskt hjälpmedel för inflammatoriska processer inom idisslarmedicin. De fann att haptoglobin nivåerna hos kalvar som injicerats med terpentin, för att inducera en inflammation, ökade kraftigt på dag 2 och 3 efter injektionen och sjönk tillbaka till normalvärden igen efter 11-17 dagar. De såg också att koncentrationen av haptoglobin även varierande beroende på hur stor dos av terpentin som administrerats, ju mer terpentin desto högre haptoglobin koncentration. De värden de fick fram låg mellan 0,52 g/l och 1,27 g/l (HbBC).

Conner et al (1986) instämmer med antagandena om att haptoglobin koncentrationen skulle fungera som ett diagnostiskt verktyg. I sin studie fann inte heller de några nämnvärda koncentrationer av haptoglobin hos friska kor men såg en stegring till medelvärdet 0,7 g/l (0,37 till 1,14 g/l HbBC) hos kor med mastit. De påtalade redan då eventuell användbarhet för haptoglobin även som prognostisk markör.

Detta stöds även av Alsemgeest et al (1994), som i sin studie även fann att en kvot av haptoglobin och serum amyloid-A skulle kunna ge en indikation om i vilket stadium inflammationen befann sig (akut, subakut, kronisk). Studien visade att medelvärdet för friska kor ej kunde detekteras, medan det hos djur som var akut sjuka i inflammatoriska tillstånd låg på 0,57 g/l (HbBC).

Att haptoglobinkoncentrationen i blodet skulle vara ett diagnostiskt verktyg för att avgöra om processen är akut eller kronisk undersöktes även av Horadagoda et al (1999). Efter en förstudie på friska individer fick de fram 0,35 g/l som en övre gräns för indikation på inflammation hos nötkreatur. De fann, som Alsemgeest et

al (1994), att en kombination av serum amyloid A och haptoglobin skulle fungera bäst för att utvärdera det inflammatoriska tillståndet. Intressant nog fann de även genom att analysera akutfasproteinerna, för diagnos av inflammatoriska tillstånd hos nötkreatur, att de fick en högre känslighet än vad en analys av "vanliga" blodvärden gav. Liknande resultat har även visats på får (Skinner och Roberts, 1994). Alsemgeest et al (1994) använde sig av en hemoglobin-binding assay och anger värdena i g/l.

Skinner et al (1991) utförde ett fältförsök där både inflammatoriska och utfodringsrelaterade sjukdomar utvärderades med hjälp av haptoglobin. De fann då att haptoglobin koncentrationen hos normala kor låg på 0,012 g/l, att värden över 0,2 g/l tyder på en tidig eller mild infektion och att värden över 0,4 g/l tyder på en allvarlig infektion. De använde en hemoglobin-binding assay och anger värdena i g/l. De såg dock ej att det fanns något samband mellan dessa högre koncentrationsnivåer och prognos. I studien fann de även att de utfodringsrelaterade sjukdomarna ej gav några signifikanta höjningar av haptoglobinkoncentrationen.

Gånheim et al (2003) utförde en studie på kalvar som experimentellt infekterades med Bovine Viral Diarrhoea Virus och/eller *Mannheimia haemolytica*. De tog sedan blodprover för att bland annat titta på eventuell höjning av haptoglobin. Proverna analyserades med hjälp av ett kommersiellt kit Tridelta Phase Range Haptoglobin Assay och värdena anges i g/l. I studien såg de att haptoglobin steg hos de infekterade kalvarna. Hos de kalvar som endast infekterades med *Mannheimia haemolytica* sågs en kraftig ökning och värdena låg mellan 1,1 och 2,0 g/l.

Studier har även utförts på kvigor för att analysera deras haptoglobinsvar vid inflammation, till exempel vid mastit (Hirvonen et al 1996). I Hirvonen et al:s studie framkom det att precis som hos kor fanns haptoglobin ej i serum hos friska individer. Vid induktion av mastit sågs dock en kraftig stegring i koncentration hos alla kvigor i studien. Stegringen ansågs, till skillnad från Skinner et al (1991) även korrelera med prognos för sjukdomen. De nivåer som Hirvonen et al (1996) kom fram till för kvigor i studien var värden på 0,19 g/l för de måttligt påverkade och 0,81 g/l för de kraftigt påverkade (HbBC). Chan et al (2004) fick i sin studie fram att normalvärden för kvigor emellertid borde ligga under 0,0736 g/l (HbBC) och att värden över detta indikerade någon form av stress. För sammanfattning av olika studiers haptoglobinvärden se tabell 1.

Tabell 1: Sammanfattande tabell över olika studiers gränsvärden för haptoglobinkoncentration för friska kor, och kor med inflammation

Källa/Studie	Haptoglobinkoncentrationer g/l		Diagnos
	Normala nivåer	Inflammation	
Makimura och Suzuki (1982)	0,051	0,17 - 1,27 (HbBC)	Nefrit, pleurit, pericardit, vasst, pyometra och mastit
Conner et al (1986)	Knappt detekterbart	0,37 - 1,14 (HbBC)	Mastit
Conner et al (1988)		0,52 - 1,27 (HbBC)	Terpentin injektion
Skinner et al (1991)	0,012	>0,2=mild el tidig infl >0,4=allvarlig infl	Mastit, metrit, ret sec
Alsemgeest et al (1994)	Ej detekterbart	Medelvärde 0,57 (HbBC)	Div. infl. Sjukdomar
Hirvonen et al 1996	Ej detekterbart	>0,19=måttligt påverkade >0,81=kraftigt påverkade (HbBC)	Mastit
Horadagoda et al (1999)		>0,35 (HbBC)	Div. infl.sjukdomar
Gånheim et al (2003)		1,1- 2,0	<i>Mannheimia haemolytica</i>
Chan et al (2004)		>0,0736=stress (HbBC)	Friska kvigor

Haptoglobin runt kalvning - kor och kvigor

Vid partus verkar en fysiologisk akutfasreaktion ske i kroppen (Alsemgeest et al 1993, Koets et al 1998, Rezamand et al 2007), och haptoglobin är ett av de akutfasproteiner som har setts öka i samband med detta hos nötkreatur (Uchida et al 1993, Sheldon et al 2001, Humblet et al 2006, Cairoli et al 2006, Eicher et al 2007, Hiss et al 2008, Stengärde et al 2008, Huzzey et al 2009,). Exakt vad denna ökning beror på är dock ännu ej helt klarlagt.

Uchida et al (1993) utförde en studie på friska kor och kvigor runt kalvning, där de mätte haptoglobin nivåerna vid olika tidpunkter före och efter kalvning, som alla var okomplicerade, för att avgöra hur värdena låg. De använde sig av immunoassay och värdena anges i haptoglobin g/l. De såg då att det var först vid 0-1 dagar efter partus som haptoglobinkoncentrationen hos de flesta djuren började stiga, för att sedan sjunka igen 1-2 veckor efter partus. De flesta av djuren vid 0-1 dagar efter partus låg under eller vid 0,5 g/l i serum haptoglobin. En tänkbar orsak till höjningen anser Uchida et al kunna vara höjningen av glukokortikoider i samband med förlossningen. Detta ska ge en stimulering av haptoglobinproduktion via bindning till haptoglobinen i levern.

Värdet 0,5 g/l användes sedan som ett övre normalt gränsvärde för haptoglobinkoncentrationen hos kor runt kalvning av Stengärde et al (2008). Proverna analyserades på Klinisk kemi, Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), och även i denna studie sågs en ökning i haptoglobinkoncentrationen runt kalvning. 27 % av de kor som provtogs låg dock över värdet 0,5 g/l, trots att korna var kliniskt friska. Stengärde et al (2008) resonerar dock att några av de högre värdena kanske kunde ha berott på infektioner eller inflammatoriska processer som ej upptäckts. Exakt vilken dag efter partus som proverna är tagna framgår dock ej av texten.

Sheldon et al (2001) såg även de i sin studie att haptoglobinkoncentrationen ökar hos friska nötkreatur runt kalvning och att nivåerna sjunker vartefter livmodern involueras. Studien använde en analysmetod vilken var kalibrerad och koncentrationerna angavs i haptoglobin g/l. Medelkoncentrationen av haptoglobin låg, i deras studie, 7 dagar efter kalvning på cirka 0,1 g/l. I studien diskuteras sambandet mellan akutfasproteinernas ökning runt kalvning och den bakteriologiska kontaminationen i livmodern. Sheldon et al (2001) ser nämligen att akutfasproteinkoncentrationen har ett samband med just graden av bakteriologisk kontamination i livmodern.

Ett relativt lågt gränsvärde på 0,1 g/l för haptoglobin diskuterades även av Humblet et al (2006). De ansåg dock att värdet var för lågt som gränsvärde runt kalvning. Istället sattes en gräns på 0,15 g/l som gränsvärde mellan sjuka och friska djur enligt tidigare studier. Haptoglobinkoncentrationen bestämdes med hjälp av dess hemoglobinbindande kapacitet som kalibrerades och värdena angavs då i haptoglobin g/l. I studien sågs en signifikant stigning i koncentration vid första veckan efter kalvning hos både kor och förstakalvare. De såg även att förstakalvare hade ett högre medelvärde för haptoglobinkoncentrationen ($0,432 \pm 0,426$ g/l) än vad korna hade ($0,198 \pm 0,347$ g/l). Detta ansågs eventuellt kunna bero på en kraftigare akutfasreaktion till följd av en större påverkan på kroppen vid första kalvningen (större vävnadsskada på till exempel vulva, vagina och uterus). Exakt vilken dag djuren provtogs framgår dock ej. Humblet et al (2006) fann även att vid jämförelse mellan värden på haptoglobin och serum amyloid A, korrelerade dessa ej fullt. De diskuterar att detta skulle kunna bero på att serum amyloid A stiger snabbare och försvinner fortare än haptoglobin. Haptoglobin ansågs emellertid vara det som skulle fungera bäst, rutinmässigt, för att diagnosticera sjuka individer. De varnar dock för att ställa för stor tillit till värdena vid förlossning på grund av det fysiologiska svaret.

Stigning i haptoglobin runt partus hos kor såg även Hiss et al (2008). Studien använde en immunoassay som var kalibrerad mot ett standard prov och kunde därför ange värdena i haptoglobin g/l. De fick fram ett normalvärde för kor, några veckor innan kalvning, som låg på 0,19 g/l. Vid provtagning cirka 1 vecka postpartum låg medelvärdet på $1,6 \pm 0,27$ g/l. Värdena ansågs sedan ha normaliserats efter cirka 3 veckor.

Eicher et al (2007) utförde en studie på friska kvigor runt kalvning. De ansåg att normalvärdet för haptoglobinkoncentrationen hos kvigorna låg under 0,2 g/l. De använde sig av immunodiffusionassay och anger värdena i g/l. I studien sågs en stigning av koncentrationen efter kalvning. Beroende på djurhållning, noterades toppkoncentrationen för haptoglobin på olika tidpunkter efter kalvning (mellan dag 3 och 7). Medel toppkoncentrationen för kvigorna låg dock runt 0,5 g/l till strax under 0,6 g/l för alla olika djurhållningssystemen. En skillnad sågs i hur länge det dröjde innan djuren nådde normala haptoglobinvärden efter partus. Hos de djur som gick i lösdrifter inomhus dröjde det till dag 10-14 efter partus innan värdena normaliserades. De djur som hade utomhus hagar och möjlighet till inomhusvistelse i lösdrift fick en tidigare normalisering av haptoglobinet, faktiskt redan på dag 7 efter partus. Eicher et al (2007) menar, med ledning av sin studie, att då akutfasproteiner används för diagnos måste hänsyn bland annat tas till vilket fysiologiskt status djuret befinner sig i. Att endast hitta förhöjda värden en gång behöver ej indikera problem, men kvarstående höga värden kan bero på stress eller sjukdom.

Chan et al (2004) såg ingen skillnad i haptoglobinvärden veckan innan jämfört med veckan efter kalvning hos kvigor i sin studie. I studien provtogs djuren endast en gång i veckan. De använde sig av hemoglobinbindande kapaciteten men kalibrerade studien och värdena anges därför i haptoglobin g/l.

Studier har även syftat till att undersöka hur bra haptoglobin fungerar för att diagnosticera och förutspå specifika sjukdomar runt kalvning. Huzzey et al (2009) utförde en studie angående hur väl haptoglobinkoncentrationen efter kalvning kunde förutspå insjuknande i metrit. I studien angavs värdena som haptoglobin g/l. I kontrollgruppen med friska kor sågs en ökning av haptoglobinkoncentrationen efter kalvning. Toppkoncentrationen nåddes 3 dagar efter kalvning och medelvärdet låg då på $0,58 \pm 0,12$ g/l. Värdet normaliserades sedan efter cirka 2 veckor. Hos de kor som senare kom att insjukna i metrit sågs också en ökning av haptoglobinkoncentrationen. Hos de med lindriga symtom sågs ett medelvärde på $1,06 \pm 0,15$ g/l som toppkoncentration dag 3 efter kalvning, medan de med allvarliga symtom låg på $1,62 \pm 0,47$ g/l, som toppkoncentration så sent som dag 6 efter kalvning. I studien sågs att haptoglobinkoncentrationen på dag 3 fungerade bra för att kunna förutse eventuellt insjuknande i metrit. Författarna kom fram till ett gränsvärde, med sammantaget bäst specificitet och sensitivitet, som låg på 1 g/l. De anser dock att nivån måste anpassas beroende på vad man är ute efter. Om alla djur som kommer över gränsvärdet till exempel behandlas, bör hänsyn snarast tas till specificiteten för att undvika falskt positiva djur. Gränsvärdet borde i så fall ligga på 1,4 g/l. Om värdet emellertid endast ska fungera som en indikator för vilka djur som bör bevakas noggrannare, för att få en tidig diagnos, är 0,4 g/l aktuellt.

Hirvonen et al (1999) gjorde även de en studie som syftade till att undersöka eventuellt samband mellan, bland annat, haptoglobinkoncentrationen i blodet och akut metrit postpartum. Studien använde sig av hemoglobinbindande kapaciteten och anges som HbBC g/l. Hos de kor som användes som kontroldjur sågs, runt kalvning, ingen direkt stigning el sjunkning av haptoglobin i blodet. De låg alla på värden under basalnivå, vilket i studien ansågs vara under 0,05 g/l. Djuren provtogs varannan dag med början cirka 4 dagar efter partus. Hos de kor som hade metrit sågs dock ingen kraftig ökning. Ett av djuren visade rent av ingen ökning alls. Hos cirka hälften av de sjuka korna låg värdena under 0,1 g/l och hos fyra av djuren mellan 0,1 och 0,7 g/l. Hos de djur som var kraftigt påverkade av sjukdom låg dock haptoglobinvärdena över 0,7 g/l. Dessa djur avlivades även senare på grund av att de var i dålig kondition. Fem djur hade också kvarbliven efterbörd. Av dessa hade endast en ett haptoglobinvärde som låg över 0,1 g/l. Författarna anser, enligt studien, att haptoglobin troligen speglar en inflammatorisk process som sträcker sig utanför endometriet, då kronisk endometrit ej visats ge några förhöjda haptoglobinvärden. De anser även att det värde Skinner et al (1991) kom fram till som gränsvärde för sjukdom, 0,4 g/l, även stöddes av deras resultat.

I Smith et als (1998) studie angående haptoglobinnivåer vid toxisk puerperal metrit fick de en medelkoncentration av haptoglobin som låg på 0,19 g/l hos kor, 2 till 16 dagar efter partus, med metrit. Hos ett antal av de sjuka djuren låg dock haptoglobinnivåerna under 0,1 g/l, som i studien anses kunna vara normalvärde. Författarna diskuterar dock att detta kan ha berott på individuella skillnader hos korna, att haptoglobinkoncentrationen ej hunnit stiga vid tillfället för provtagning hos vissa djur. Proverna togs första dagen då kliniska symtom upptäcktes och haptoglobin kan behöva 2 till 3 dagar på sig att stiga. Utöver att haptoglobin skulle fungera som diagnostisk hjälp ansåg de även att genom att mäta haptoglobinkoncentrationen kunna utvärdera behandlingen. Proverna analyserades med immunoassay och jämfördes med en standard kurva. Värdena angavs i haptoglobin g/l.

Skinner et al (1991) studerade olika sjukdomar, bland annat kvarbliven efterbörd (3-5 dagar efter partus). I studien använde de sig av hemoglobinbindande kapaciteten och jämförde med standardprov. Värdena angavs i haptoglobin g/l. De djur som diagnosticerade med kvarbliven efterbörd hade ett medelvärde av haptoglobinkoncentrationen som låg på $0,76 \pm 0,14$ g/l. Några av dessa uppvisade feber och aptitlöshet och vissa antibiotika behandlades. De förhöjda värdena vid kvarbliven efterbörd, diskuterar författarna, eventuellt skulle kunna ha berott på skador som djuret fått i samband med kalvning. De menar dock att de ej sett förhöjda haptoglobinvärden hos kor efter normal förlossningsprocess.

Andra akutfasproteinerna har även studerats efter kalvning, framför allt serum amyloid-A. Alsemgeest et al (1993) ansåg att en trolig anledning till den akutfasreaktion som ses hos till synes friska djur sker på grund av den vävnadsskada som sker vid kalvning. Detta ansåg även Koets et al (1998) vara en trolig anledning till de inflammationsliknande förändringarna som setts efter kalvning. För sammanfattning av olika studiers haptoglobinvärden se tabell 2.

Tabell 2: Sammanfattande tabell över olika studiers gränsvärden för haptoglobinkoncentration efter kalvning för friska kor, sjuka kor samt förstakalvare

Källa/Studie	Haptoglobinkoncentrationer g/l efter kalvning		
	Friska kor	Förstakalvare	Sjuka kor
Skinner et al (1991)	Ingen skillnad hos kor ap vs pp		0,76 ± 0,14 ret sec 3-5d pp
Uchida et al (1994)	<=0,5 0-1d pp		
Hirvonen et al (1999)	<0,05 4d pp ingen ökning pp (HbBC)		0,1-0,7 alt ingen ökning MS >0,7 AS (HbBC)
Sheldon et al (2001)	Medel ca 0,1 7d pp		
Chan et al (2004)		Ingen skillnad ap vs pp	
Humblet et al (2006)	<= 0,15 1 v	Högre medelvärde	
Eicher et al (2007)		Medel ca 0,5-0,6 1v pp	
Hiss et al (2008)	Medel 1,6 ± 0,27 1v pp		
Stengärde et al (2008)	Strax över 0,5		
Huzzey et al 2009	Medel 0,58 ± 0,12 3d pp Gränsvärde 1,0 el 1,4 el 0,4		Medel 1,06 ± 0,15 3d pp MS Medel 1,62 ± 0,47 6d pp AS

MS= Mild Sjukdom AS= Allvarlig Sjukdom

Användningsområden

Haptoglobin är, som beskrivits tidigare, en inflammationsmarkör och haptoglobinkoncentrationen i serum eller plasma kan användas för att hjälpa till att ställa diagnos hos sjuka nötkreatur (Eckersall et al 2007). Det har även diskuterats att använda haptoglobin och andra akutfasproteiner för att hitta subklinisk mastit och för att undersöka mjölksammansättningen (Eckersall et al 2006, Åkerstedt et al 2007). Ett annat användningsområde på individnivå som diskuterats är om haptoglobinkoncentrationen skulle kunna användas som hjälp för att se i vilket sjukdomsstadium som djuret befinner sig (Alsemgeest et al 1994, Horadagoda et al 1999). Likaså har studier visat att haptoglobin kan användas för att utvärdera behandlingar (Smith et al 1998) och för att uppskatta prognosen (Conner et al 1986, Hirvonen et al 1999).

Utöver de ovan nämnda användningsområdena på individnivå har även haptoglobins användning på besättningsnivå diskuterats. Gånheim et al (2007) ansåg att akutfasproteiner i framtiden kan vara ett bra hjälpmedel för att utvärdera hälsostatus hos besättningar rutinmässigt. Problemet idag, anser författarna dock, är att analyserna kostar för mycket pengar för att rutinmässig användning ska ske. Även Skinner and Roberts (1994), Petersen et al (2003), Murata et al (2004) och Huzzey et al (2008) påtalar även de haptoglobin och andra akutfasproteiners användbarhet för att utvärdera hälsostatus på en besättning. Eckersall et al 2001 tar upp möjligheten att, hos framför allt robotbesättningar, lättare hitta kor med subkliniska eller kliniska mastiter genom att mäta haptoglobin i mjölken.

Haptoglobin har även diskuterats som en parameter för att höja livsmedelssäkerheten genom att analysera haptoglobinkoncentrationen hos djur vid slakt (Saini 1998, Eckersall 2007). Lomborg et al (2008) tar även upp möjligheten att använda haptoglobinvärden för att utvärdera djurskyddet. Haptoglobin har nämligen setts stiga vid tillstånd av stress så som till exempel vid transport, hala golv, uppbundna stall. På detta sätt kan värdena användas för att till exempel utvärdera olika produktionssystem och olika djurhållningssystem (Lomborg et al 2008). Även möjligheten att utvärdera djurskyddet i samband med slakt har påtalats (Eckersall 2007).

MATERIAL OCH METODER

Djururval

I studien var 12 förstakalvare och 29 äldre kor (2:a-6:e kalvare) med. Av de äldre korna kom 23 att definieras som friska och 6 som sjuka. Korna ingick i en studie av kalciumutfodring innan kalvning och provtogs i samband med detta. Djuren hölls under studien på Kungsängens försöksgård. Där stod korna uppbundna under sinperioden och även veckan efter kalvning. Före och efter kalvning utfodrades de enligt norm för energi och protein. Efter kalvning byttes dock kraft- och grovfodret helt. Efter kalvning (under den aktuella veckan) mjölkades korna 2 gånger per dag.

Även 12 förstakalvare var med i studien. Inga av förstakalvarna insjuknade under försöket vilket ledde till att ingen sådan grupp bildades. Djuren medverkade i en studie av effekterna av glukoshöjande medel i tidig laktation och provtogs i

samband med detta försök. Förstakalvarna hölls under tiden för studien på Kungsängens försöksgård. De stod uppbundna och utfodrades enligt norm, förutom extra utfodring med glycerol per os. Djuren mjölkades två gånger per dag.

De kor som definierades som sjuka diagnosticerades med olika inflammatoriska sjukdomar under försökstiden eller störningar i samband med kalvningen. En första bedömning gjordes av skötselpersonal på plats medan sjukdomsdiagnosen ställdes av veterinärer verksamma på SLUs ambulatoriska klinik. Djuren behandlades sedan efter gängse princip för aktuell sjukdom. Sjukdomar djuren hade var livmoderinfektion (metrit), juverinflammation (mastit) och kvarbliven efterbörd (ret sec). Diagnosen kvarbliven efterbörd diagnosticerades dock av personal på gården och skedde om efterbörden ej hade släppts 24 timmar efter förlossningen. Ingen behandling sattes dock in på dessa.

Provtagning

Blodprov togs på korna 1 dag före kalvning (ap), 24 timmar/1 dag efter kalvning (d pp.), 2, 4 och 7d pp. Kvigorna provtogs mer oregelbundet och inga prov togs före kalvning då studien de var med i ej behövde blodprov vid den tidpunkten. Övriga blodprov togs mellan 0-18 dagar efter kalvning. Proverna togs i vacutainer-rör utan serum. Serum separerades genom centrifugering och förvarades frysta i -20°C i upp till 14 månader.

Analys av blodprov

169 blodprover analyserades, varav 145 från kor och 24 från kvigor. Blodproverna analyserades vid avdelningen för Klinisk kemi, Universitetsdjursjukhuset, SLU, Uppsala med hjälp av ett kommersiellt kit (PHASE RANGE, haptoglobin Assay, Tridelta Development Ltd, Bray, Irland) enligt tillverkarens föreskrifter.

I analysen används haptoglobins förmåga att binda till fritt hemoglobin samt att hemoglobin uppvisar en peroxidasaktivitet (vilken inhiberas vid lågt pH) (PHASE RANGE manual). Till provet sätts ett reagens som bland annat innehåller fritt hemoglobin. Detta binds upp av haptoglobinet i provet och på så sätt bevaras hemoglobinet peroxidasaktivitet vid lågt pH. Detta är i sin tur, direkt proportionellt mot mängden haptoglobin i provet. Analysen kalibreras med ett standardiserat haptoglobinprov. Inga av de prover som analyserades var hemolyserade. Av tillverkaren anges som normalvärden för nötkreatur 0,0-0,05 g/l. För akuta tillstånd anges att värdena bör ligga mellan 0,1 och 3,0 g/l.

Statistisk metod

Two-sample t-test (Minitab, version 2007) användes för att jämföra haptoglobinkoncentrationen hos friska och sjuka kor samt före och efter kalvning hos friska kor.

För att på ett relevant sätt kunna jämföra förstakalvarnas värden med de äldre kornas valdes endast de djur med prover tagna mellan 0-7 dagar efter kalvning ut. Detta gjorde att av de 24 analyserade blodproverna från förstakalvare kom endast

11 prover att användas i analysen. Förstakalvarnas haptoglobinkoncentrationer delades sedan upp i två grupper. Grupp 1 innefattade prover tagna dag 0 efter kalvning till och med dag 2 efter kalvning. I grupp 2 hamnade de prover som togs dag 4 efter kalvning till och med dag 7 efter kalvning. Grupp 1 jämfördes sedan med de prover hos korna som togs dag 1 till och med dag 2 och grupp 2 jämfördes med de prover hos korna som togs dag 4 till och med dag 7. Förstakalvare misstänks, som grupp, få ett kraftigare haptoglobinsvar runt kalvning än äldre kor. Jämförelsen är därför intressant även om materialet inte är helt optimalt. Detta då förstakalvarna provtagits mer utspritt över en längre tid och endast ett fåtal prover faller in under relevant tid.

RESULTAT

Friska kor runt kalvning

Hos de friska korna sågs en ökning i serumkoncentrationerna av haptoglobin efter kalvning. Koncentrationerna kan ses i tabell 3.

Statistisk jämförelse av haptoglobinkoncentrationerna hos djuren före kalvning och de olika dagarna efter kalvning visade signifikanta skillnader. Skillnaden var störst redan dag 1 och 2 efter kalvning. Detta visas i tabell 4. Två kor avviker från de övriga genom att knappt få någon stegring alls efter kalvning (kor 1010 och 1241) och 3 fick endast mycket lindrig ökning (1247, 1313 och 1320).

Tabell 3: Individuella haptoglobinkoncentrationer hos 23 friska 2:a-kalvare och äldre kor olika dagar postpartum (d pp)

Ko	Haptoglobinkoncentrationer g/l				
	Antepartum	1d pp	2d pp	4d pp	7d pp
1010	0,24	0,27	0,28	0,31	0,26
1030	0,25	0,43	0,44	0,29	0,22
1090	0,14	0,6	1,08	0,53	0,22
1192	0,18	0,43	0,51	0,2	0,17
1202	0,27	0,65	0,75	0,33	0,2
1240	0,28	0,46	0,44	0,21	0,19
1241	0,17	0,22	0,18	0,18	0,25
1247	0,2	0,42	0,36	0,19	0,16
1261	0,15	0,39	0,42	0,22	0,21
1278	0,13	0,38	0,42	0,17	0,14
1288	0,18	0,56	0,61	0,29	0,23
1291	0,17	0,52	0,57	0,18	0,17
1296	0,14	0,53	0,52	0,25	0,23
1303	0,13	0,35	0,27	0,23	0,19
1305	0,26	0,52	0,69	0,57	0,21
1313	0,15	0,31	0,4	0,32	0,33
1314	0,25	0,53	0,61	0,19	0,27
1315	0,15	0,34	0,58	0,16	0,22
1316	0,17	0,42	0,54	Saknas	0,17
1317	0,2	0,89	0,99	0,52	0,21
1320	0,15	0,27	0,24	0,23	0,12
1327	0,13	0,36	0,76	1,43	0,33
1328	0,3	0,58	0,71	0,49	0,25

Tabell 4: Jämförelse mellan medelserumkoncentrationen av haptoglobin före kalvning (ap) och 1-, 2-, 4- och 7 dagar efter kalvning (d pp) hos friska kor

Tidpunkt	Haptoglobin g/l	Signifikans
Ap	0,19	
1d pp	0,45	***
2d pp	0,54	***
4d pp	0,34	*
7d pp	0,22	ES

ES=Ej Signifikanta skillnader, *=P<0,05, *** P<0,001

Sjuka kor runt kalvning

Av 29 2:a kalvare och äldre kor som kom att delta i studien kom 6 stycken att klassas som sjuka. Dessa kors individuella haptoglobinkoncentration samt diagnos(er) visas i tabell 5.

Tabell 5: Serumkoncentrationen av haptoglobin hos de sjuka korna samt deras sjukdomsproblem

Ko	Haptoglobin g/l					Förlossning	Ret sec	Diagnos
	Ap	1d pp	2d pp	4d pp	7d pp			
1137	0,39	1,16	1,48	1,56	1,45	Tvillingar	X	
1198	0,17	0,37	0,57	0,49	0,31		X	
1227	0,18	1,39	2,43	3,24	1,76	Kalven dog	X	Metrit 2d pp
1251	0,13	0,51	1,61	3,27	1,83			Mastit 4d pp
1259	0,21	0,55	0,65	0,4	0,36		X	
1263	0,28	0,85	1,52	2,32	2,48	Tvillingar	X	Metrit 4d pp

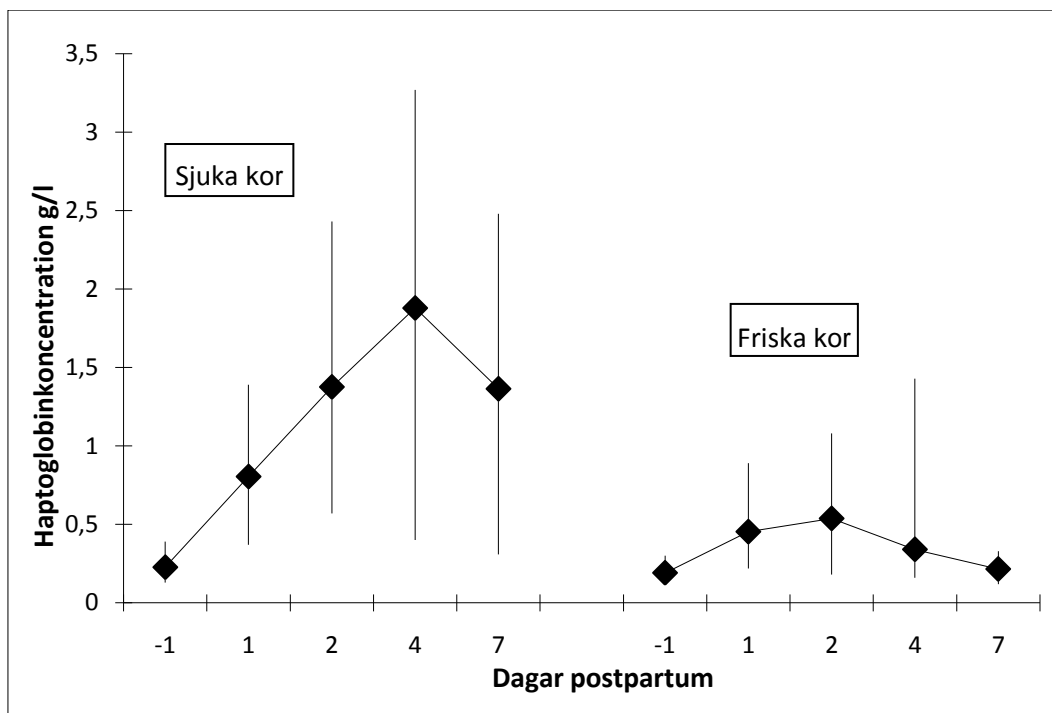
Det var en signifikant skillnad mellan sjuka och friska kor (Tabell 6). Ko 1198 och 1259 avviker genom att ej få någon kraftig stegring.

Tabell 6: Jämförelse av medelkoncentrationen av haptoglobin mellan sjuka och friska kor antepartum (ap), 1-, 2-, 4- och 7 dagar postpartum (d pp)

Tidpunkt	Haptoglobin g/l		Signifikans
	Friska	Sjuka	
Ap	0,19	0,23	ES
1d pp	0,45	0,81	ES
2d pp	0,54	1,38	*
4d pp	0,34	1,88	*
7d pp	0,22	1,37	*

ES=Ej Signifikanta skillnader, *=P<0,05

Vid jämförelse med de friska korna kan högre numeriska värden av haptoglobinkoncentrationen ses hos de sjuka korna redan 1 dag efter kalvning (Figur 1). Detta trots att sjukdomarna tidigast diagnostiserades 2 dagar postpartum.



Figur 1: Haptoglobinvärden i g/l hos sjuka och friska kor postpartum. Staplarna visar max- och minvärden.

Förstakalvare runt kalvning

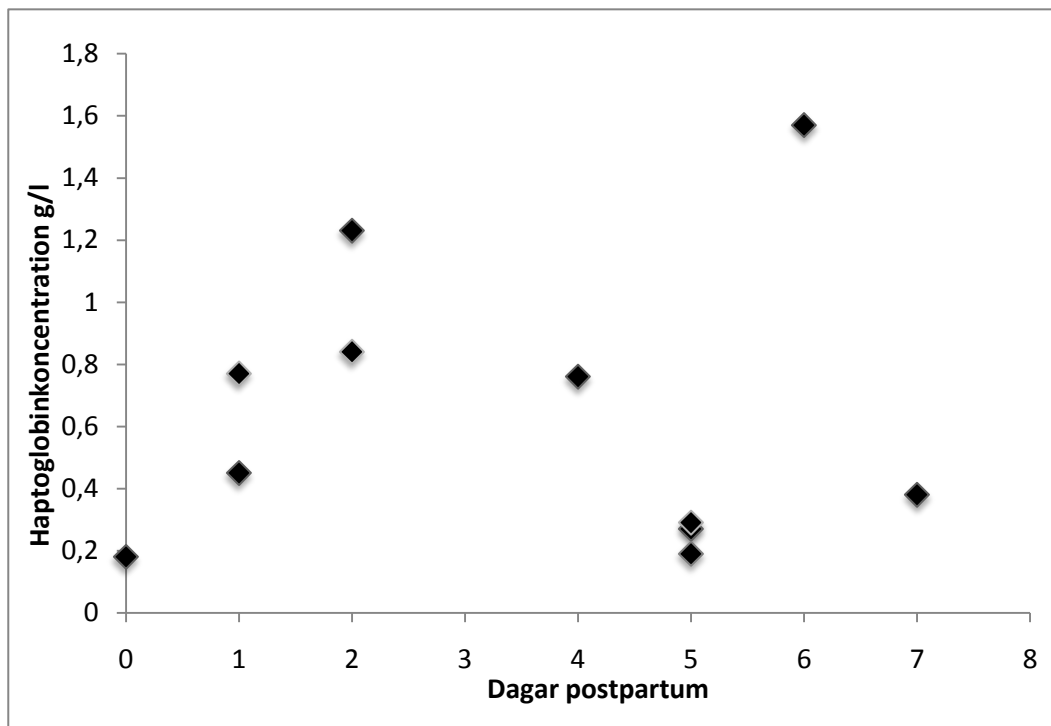
Vid jämförelse mellan förstakalvare och friska kor vid samma tider sågs ingen signifikant skillnad (Tabell 7).

Tabell 7: Jämförelse av haptoglobinvärden hos förstakalvare och friska äldre kor 0-2 dagar samt 4-7 dagar postpartum (d pp)

Tidpunkt	Haptoglobin g/l		Signifikans
	Friska kor	Förstakalvare	
0-2d pp	0,50	0,69	ES
4-7d pp	0,28	0,58	ES

ES= Ej Signifikanta skillnader

Förstakalvarnas enskilda värden kan ses i figur 2.



Figur 2: Haptoglobinvärden i g/l hos kvigor efter kalvning.

DISKUSSION

Medelkoncentrationen hos de friska korna taget före kalvning var 0,19 g/l. Vid jämförelse mellan före och efter kalvning hos dessa kor sågs en signifikant skillnad 1, 2 och 4 dagar post partum. Dessa resultat visar att haptoglobinkoncentrationen stiger hos kor runt kalvning och stämmer överens med fynd från andra studier (Uchida et al 1993, Sheldon et al 2001, Stengärde et al 2008, Humblet et al 2006, Hiss et al 2008, Huzzey et al 2009). Detta till skillnad från Hirvonen et al (1999), Skinner et al (1991) och Chan et al (2004), som inte såg några skillnader i haptoglobinkoncentration efter kalvning. En förklaring till att dessa studier ej såg någon höjning kan vara den tidpunkt som djuren provtogs. Hirvonen et al (1999) provtog inte sina djur förrän 4 dagar efter partus och Chan et al (2004) provtog endast en gång i veckan. Av Skinner et al (1991) artikel framgår det ej klart hur författarna kommit fram till åsikten.

Endast tidpunkt verkar dock ej vara det som är avgörande. De koncentrationer Hirvonen et al (1999) fick låg runt 0,05 g/l dag 4 postpartum. Detta är intressant då ingen av korna, vilka har redovisats i resultatdelen ovan, hade så låga koncentrationer dag 4 eller ens dag 7. Ett antal av korna kommer dock ner i samma nivå som före kalvning. Om djuren i Hirvonen et al (1999) studie hade låga värden innan kalvning skulle det vara möjligt att de sjunkit tillbaka till dessa. Koncentrationerna som uppmättes var dock mycket låga, inte bara vid jämförelse med den här studien. En orsak till detta kan vara att olika analysmetoder användes. De kraftigt varierande värdena i studier som använt olika analysmetoder gör att de gränsvärden som denna studie kommit fram till troligen enbart fungerar för den metod som använts i just denna studie.

Det är intressant att se att toppkoncentrationens tidpunkt varierar mellan djuren. Hos större delen av djuren hamnade den 2 dagar efter kalvning. Cirka 30 % av korna hade dock toppkoncentrationen av haptoglobin 1 dag efter partus. Detta stämmer med tidigare studier som visat att det tar 1 till 2 dygn för haptoglobin att stiga i blodet. Ett fåtal kor fick i den här studien emellertid sin toppkoncentration på dag 4 efter partus. Eicher et al 2001 fick i sin studie toppkoncentrationer mellan dag 3 och 7 hos friska djur (enbart förstakalvare som studerades).

Medelvärdet för toppkoncentrationen var 0,54 g/l, men de individuella toppvärdena varierade mellan 0,25 och 1,43 g/l. Båda dessa faktorer visar ganska tydligt vilken individualitet det finns i haptoglobinsvar efter kalvning. Skillnader i kornas individuella immunförsvar kan bidra, men det är troligare att det är kornas individuella problem efter kalvning som ger upphov till skillnader. Skinner et al (1991) tar upp huruvida skador i samband med kalvning kan påverka haptoglobinkoncentrationen och bakteriekontaminationen i livmodern är en annan faktor (Sheldon et al 2001). Båda dessa faktorer skulle kunna vara orsak till de stora skillnaderna i haptoglobinkoncentration som sågs i min studie. Alla kor i studien stod uppbundna och inhysningssystem borde därför inte ha varit en faktor som spelat någon roll. Eicher et al (2007) visar annars att detta ger olikheter i haptoglobinnivåer. Intressant nog ses i mina resultat att fem av de friska korna ej fick någon direkt ökning av haptoglobinkoncentrationen. Detta kan tolkas som att det, eventuellt, egentligen är dessa kor som har normalnivåer runt kalvning. Alltså att normal förlossning och cortisolökningen i samband med den naturliga förlossningsinduktionen ej behöver ge någon tydlig ökning i haptoglobin.

De djur som var sjuka med inflammatoriska sjukdomar i studien diagnostiserades dag 2 och 4 efter kalvning. Hos de sjuka ses en kraftigare höjning i haptoglobinkoncentration, jämfört med hos de friska korna. Ingen skillnad kan dock ses innan kalvning. Det är intressant att en relativt tydlig höjning ses redan innan insjuknande. Detta gör att det kan bli möjligt att förutspå sjukdomar, precis som tidigare studier haft funderingar kring.

Alla sjuka fick dock inte en kraftig höjning i koncentration. De två djuren (kor 1198 och 1259) som ej fick kraftigare ökning än de friska djuren hade endast kvarbliven efterbörd som problem efter kalvning. Detta kan troligen bero på att djuren ej fick något problem av den kvarblivna efterbörden. Kvarbliven efterbörd diagnosticerades nämligen om efterbörden var kvar 24 timmar efter kalvning, vilket kan vara normalt. Skinner et al (1991) fann dock att djur med kvarbliven efterbörd fick en stegring i haptoglobinsvar. Skillnaden ligger dock troligen i att i deras studie diagnosticerades djuren med kvarbliven efterbörd endast om det var 3-5 dagar efter kalvning. Detta kan på ett mer rättvist sätt representera kvarbliven efterbörd då en dag efter kalvning är för tidigt för att anse det sjukligt. Ytterligare ett djur (ko 1137) hade endast kvarbliven efterbörd som problem, men hade höga koncentrationer ändå. Noteras bör också att denna ko hade fått tvillingar. Det skulle kunna vara så att efterbörden hos denna ko var kvar längre än hos de övriga och faktiskt orsakade problem. En annan orsak skulle kunna vara att denna ko fått kraftigare skador i förlossningsvägarna på grund av tvillingfödsel. Det är dock svårt att säga om denna ko eller de andra två med endast kvarbliven efterbörd som problem bör betraktas som "sjuka". Detta då inget journalförts angående detta.

Förstakalvare misstänktes som grupp få ett kraftigare haptoglobinsvar än korna. Vid statistisk analys kunde ingen signifikant skillnad ses mellan grupperna, men förstakalvarna hade ett numeriskt högre medelvärde än de friska äldre korna. 4 av 6 förstakalvare (inom 4 dagar postpartum) ligger över 0,7 g/l. Endast 5 av 23 friska kor kommer upp i värden över 0,7 g/l. Dessa resultat stämmer med Humblet et al (2006), som också såg högre medelvärde hos förstakalvare efter kalvning. För att få tydligare resultat och signifikanta värden bör flera förstakalvare provtas dag 1-2 efter kalvning.

Ett flertal olika värden har angivits som normalvärden för friska kor runt kalvning. Det är dock inte bara värdena i sig som är intressanta utan även vilken dag de är tagna på. Av mina resultat kan utläsas att korna får en stegring i haptoglobinkoncentrationen de första 2 dagarna för att sedan sjunka och vara tillbaka på nivåer som innan kalvning redan efter 7 dagar. Detta betyder att ett värde som kan anses normalt dag 2, kan anses onormalt dag 4. På grund av detta är det viktigt att tänka på vilka dagar tidigare studier provtagit sina djur för att kunna göra en jämförelse. Det är även viktigt att tänka på detta vid användandet av haptoglobinkoncentrationen som diagnostikum, vilket också Huzzey et al (2009) och Humblet et al (2006) tar upp i sina respektive studier.

Uchida et al (1993) kom fram till att friska, normala kor skulle ligga under eller lika med 0,5 g/l dag 0-1 efter kalvning. Stengärde et al (2008) använde sig av detta värde men drygt 1/4 av djur utan registrerad sjukdom låg strax över detta värde. Huzzey et al (2009) visade ett medelvärde för friska, normala kor på dag 3 efter kalvning som låg på 0,58 g/l. Dessa värden är intressanta då det medelvärde som korna i den här studien hade dag 1 efter kalvning var 0,45 g/l och dag 2 efter kalvning 0,54 g/l. Dag 1 efter kalvning låg dock cirka 40 % av djuren över 0,5 g/l, men endast 7 % över 0,6 g/l. Dag 2 hade faktiskt mer än 50 % av korna i den här studien värden över 0,5 g/l, men endast 13 % över 0,8 g/l. Ett vanligt sätt att få fram ett gränsvärde för en population är att ta medelvärdet + 2 SD och görs detta för de friska korna på dag 2 efter kalvning fås 0,99 g/l.

Humblet et al (2006), Sheldon et al (2001) och Smith et al (1998) kommer i sina studier fram till gränsvärden som alla ligger runt 0,1 g/l. Dessa värden ligger lägre än vad mina resultat visar dag 4 och 7 i den här studien. Detta kan bero på olika analysmetoder eller skillnader hos de djur som använts. Eventuellt kan också, som Eicher et al (2007) visade, olika djurhållningssystem och skötselfaktorer ha påverkat haptoglobinkoncentrationerna.

De sjuka djurens värden börjar framför allt avvika dag 2 efter kalvning, då man ser den första signifikanta skillnaden mellan sjuka och friska djur. 67 % av djuren låg då över 1,0 g/l. De två djur som ej fått någon höjning dag 2 är de med endast kvarbliven efterbörd som problem och dessa två kan eventuellt istället betraktas som friska djur. Huzzey et al (2009) anger tre olika gränsvärden beroende på vad dessa ska användas till. De anger 1,0 g/l som ett gränsvärde dag 3 för att kunna förutse metrit. Detta stämmer överens med värdena från dag 2 i den här studien, då medel + 2sd ger ett gränsvärde på 0,99 g/l.

I studier av inflammationssjukdomar hos nötkreatur, vilka ej befinner sig vid kalvning, ligger gränsvärdena mycket lägre än vad som diskuterats ovan. Horadagoda et al (1994), Skinner et al (1991) och Hirvonen et al (1996) har kommit fram till gränsvärdet mellan 0,2-0,4 g/l. Att använda dessa värden runt kalvning verkar inte fungera då en stor andel av de friska djuren ligger över 0,4 g/l den första veckan efter kalvning. Alsemgeest et al (1994) fick ett medelvärde hos djur med inflammationssjukdomar på 0,57 g/l. Detta kan jämföras med medelvärdet dag 2 efter kalvning hos friska kor på 0,54 g/l i den här studien. Skillnaden i värdena belyser ytterligare nödvändigheten att hitta normalvärden och gränsvärden specifika för kor efter kalvning samt specifika för metoden och labbet. Makimura och Suzuki (1982), Conner et al (1988) och Conner et al (1986) visade dock värden som låg över 1,0 g/l hos djur med inflammation/infektion, vilket stämmer överens med resultaten från den här studien.

Huzzey et al (2009) diskuterar i sin studie användandet av olika gränsvärden beroende på vad de ska användas till. Detta resonemang tycker jag är intressant. På detta sätt skulle man kunna anpassa diagnostiken för att få bästa resultat. Värdet 0,8 g/l skulle till exempel kunna ses som en markör för ökad risk för sjukdom och användas som en indikation för extra övervakning av djur. Anledningen till att 0,8 g/l väljs istället för 0,99 g/l är att resultat i denna och andra studier tyder på att normal och fungerande kalvning ej behöver ge en kraftig ökning i haptoglobin. De som har lite högre värden har troligen skador eller problem som inte behöver ge tydliga kliniska symtom. Därför behövs troligen ett lägre värde som övervaknings gräns. I Huzzey et al (2009) studie diskuterades även värdet av att hitta rätt dag för att få rättvis diagnostik då värdena förändras relativt kraftigt veckorna efter kalvning. Detta stöds även av resultaten från den här studien.

SLUTSATS

I studien ses en ökning av haptoglobin efter kalvning, hur kraftig ökningen är varierar dock. Haptoglobin får sin toppkoncentration 2 dagar efter kalvning för att sedan sjunka till nivåer som en vecka efter kalvning är jämförbara med före kalvning. Dag 2 verkar vara ett bra tillfälle att övervaka kor för att se om några ligger över ett visst gränsvärde. Dag 2 är nämligen den första dagen med signifikanta skillnaden mellan sjuka och friska djur. 1,0 g/l verkar vara ett bra gränsvärde för att förutse sjukdom. Resultaten i den här studien tyder på att normala haptoglobinvärden för kor dag 2 efter kalvningen ligga under 0,8 g/l.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Åkerstedt, M., Persson Waller K. och Sternesjö Å. (2007) Haptoglobin and serum amyloid A in relation to the somatic cell count in quarter, cow composition and bulk tank milk samples. *Journal of Dairy Research* 74, 198-203
- Alsemgeest, S.P.M., Kalsbeek, H.C., Wensing, Th., Koeman, J.P., van Ederen A.M. och Gruys E. (1994) Concentrations of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin (Hp) as parameters of inflammatory diseases in cattle. *The Veterinary Quarterly* 16, 21-23
- Alsemgeest, S.P.M., Tavern, M.A.M., Boosman, R., van der Weyden B.C. och Gruys E. (1993) Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. *American Journal of Veterinary Research* 54, 164-167
- Baumann H. och Gauldie J. (1994) The acute phase response. *Immunology Today* 15, 74-80
- Baumann, H., Prowsw, K.R., Marinkovic, S., Won K-A. och Jahreis G.P. (1989) Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Annals New York Academy of Science* 557, 280-295
- Cairolì, F., Battocchio, M., Veronesi, M.C., Brambilla, D., Conserva, F., Eberigini, I., Wait R. och Gianazza E. (2006), Serum protein pattern during cow pregnancy: Acute-phase proteins increase in the peripartum period. *Electrophoresis* 27, 1617-1625
- Chan, J.P-W., Chu, C.C., Fung, H.P., Chuang, S.T., Lin, Y.C., Chu R.M. och Lee S.L. (2004) Serum haptoglobin concentration in cattle, *Journal of Veterinary Medical Science* 66, 43-46
- Conner, J.G., Eckersall, P.D., Doherty M. och Douglas T.A. (1986) Acute phase response and mastitis in the cow. *Research in Veterinary Science* 41, 126-128
- Conner, J.G., Eckersall, P.D., Wiseman, A., Aitchinson T.C. och Douglas T.A. (1988) Bovine acute phase response following turpentine injection. *Research in Veterinary Science* 44, 82-88
- Eckersall P.D. (2007) Acute phase protein: biomarkers of disease in Cattle and Sheep, *Cattle Practice* 15, 240-243
- Eckersall P.D. och Conner J.G. (1988) Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary Research Communications* 12, 169-178
- Eckersall P.D. och Conner J.G. (1990) Plasma Hp in cattle (*Bos Taurus*) exists as polymers in association with albumin. *Comp Biochem. Physiol. B* 96, 309-314
- Eckersall, P.D., Duthie, S., Toussaint, M.J.M., Gruys, E., Heegard, P., Alava, M., Lipperheide C. och Madec F. (1999) Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins, *Advances in Veterinary Medicine* 41, 643-655
- Eckersall, P.D., Young, F.J., McComb, C., Hogarth, C.J., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan A.M. och Fitzpatrick J.L. (2001) Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis, *The Veterinary Record* 148, 35-41
- Eckersall, P.D., Young, F.J., Nolan, A.M., Knight, C.H., McComb, C., Waterston, M.M., Hogarth, C.J., Scott E.M. och Fitzpatrick J.L. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 89, 1488-1501
- Eicher, S.D., Schutz, M., Kearney, F., Willard, S., Bowers, S., Gandy S. och Graves K. (2007) Prepartum milking on parlour behavior, endocrine and immune responses in Holstein heifers. *Journal of Dairy Research* 74, 417-424

- Gånheim, C., Alenius, S., Persson Waller, K. (2007) Acute phase proteins as indicators of calf herd health. *The Veterinary Journal* 173, 645-651
- Hirvonen, J., Huszenicza, G., Kulcsár M. och Pyörälä S. (1999) Acute-phase response in dairy cows with acute postpartum metritis. *Theriogenology* 51, 1071-1083
- Hirvonen, J., Pyörälä S. och Jousimies-Somer H. (1996) Acute phase response in heifers experimentally induced mastitis. *Journal of Dairy Research* 63, 351-360
- Hiss, S., Weinkauf, C., Hachenberg, S. och Sauerwein H. (2008) Short Communication: Relationship between metabolic status and the milk concentrations of haptoglobin and lactoferrin in dairy cows during early lactation. *Journal of Dairy Science* 92, 4439-4443
- Horadagoda, N.U., Knox, K.M., Gibbs, H.A., Reid, S.W.J., Horadagoda, A., Edwards S.E.R. och Eckersall P.D. (1999) Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *The Veterinary Record* 144, 437-441
- Humblet, M-F., Guyot, H., Boudry, B., Mbayahi, F., Hanzen, C., Rollin R. och Godeau J-M. (2006) Relationship between haptoglobin, serum amyloid A, and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period. *Veterinary Clinical Pathology* 35, 188-193
- Huzzey, J.M., Duffield, T.F., LeBlanc, S.J, Veira, D.M., Weary D.M. och von Keyserlingk M.A.G. Short communications: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *Journal of Dairy Science* 92, 621-625
- Koets, A.P., de Schwartz, N., Tooten, P., kankofer, M., Broekhuijsen-Davies, J.M., Rutten, V.P.M.G., van Leengoed, L.A.M.G., Taverne M.A.M. och Gruys E. (1998) Release of proinflammatory cytokines related to luteolysis and the periparturent acute phase response in prostaglandin-induced parturition in cows. *Theriogenology* 49, 797-812
- Lomborg, S.R., Nielsen, L.R., Heegard P.M.H. och Jacobsen S. (2008) Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Veterinary Research Communications* 32, 575-582
- Makimura S. och Suzuki N. (1982) Quantative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Japanese journal of Veterinary Science* 44, 15-21
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M. (2004) Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal* 168, 28-40
- Petersen, H.H., Nielsen J.P. och Heegard P.M.H. (2004) Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35, 163-187
- PHASE RANGE, Haptoglobin Assay, Tridelta Development Ltd, Bray, Irland
- Rezamand, P., Hoagland, T.A., Moyes, K.M., Silbart L.K. och Andrew S.M. (2007) Energy status, lipid-soluble vitamins, and acute phase proteins in periparturent holstein and jersey dairy cows with or without subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 90, 5097-5107
- Saini, P.K., Riaz, M., Webert, D.W., Eckersall, P.D., Young, C.R., Stanker, L.H., Chakrabarti E. och Judkins J.C. (1998) Development of a simple enzyme immunoassay for blood haptoglobin concentration in cattle and its application in improving food safety. *American Journal of Veterinary Research* 59, 1101-1107.
- Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft A. och Dobson H. (2001) Acute phase responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *The Veterinary Record* 148, 172-175

- Skinner J.G. och Roberts L. (1994) Haptoglobin as an indicator of infection in sheep. *The Veterinary Record* 134, 33-36
- Skinner, J.G., Brown, R.A.L.I. och Roberts L. (1991) Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions, *The Veterinary Record* 128, 147-149
- Smith, B.I., Donovan, G.A., Risco, C.A., Young C.R. och Stanker L.H. (1998) Serum haptoglobin concentrations in Holstein dairy cattle with toxic puerperal metritis. *The Veterinary Record* 142, 83-85
- Stengärde, L., Tråvén, M., Emanuelsson, U., Holtenius, K., Hultgren J. och Niskanen R. (2008) Metabolic profiles in five high-producing Swedish dairy herds with a history of abomasal displacement and ketosis. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50:31
- Uchida, E., Katoh N. och Takahashi K. (1993) Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition, *The Journal of Veterinary Medical Science* 55, 893-894